

12

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

21 Anmeldenummer: 84106420.7

22 Anmeldetag: 05.06.84

51 Int. Cl.⁴: **C 07 D 305/12**
 //(C07D305/12, C12P17/02,
 C12R1/465)

30 Priorität: 22.06.83 CH 3415/83

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung:
 02.01.85 Patentblatt 85/1

84 Benannte Vertragsstaaten:
 AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

71 Anmelder: F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO.
 Aktiengesellschaft

CH-4002 Basel(CH)

72 Erfinder: Hadvary, Paul, Dr.
 Neumattenweg 8
 CH-4105 Biel-Benken(CH)

72 Erfinder: Hochuli, Erich, Dr.
 Kirchackerstrasse 25
 CH-4411 Arisdorf(CH)

72 Erfinder: Kupfer, Ernst, Dr.
 St. Alban-Rheinweg 180
 CH-4052 Basel(CH)

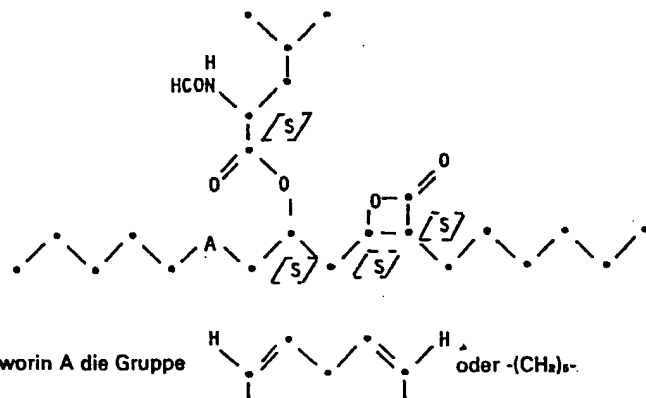
72 Erfinder: Längsfeld, Hans, Dr.
 Unterer Rebbergweg 96
 CH-4153 Reinach(CH)

72 Erfinder: Weibel, Ernst Karl, Dr.
 Vogtacherweg 3
 CH-4133 Pratteln(CH)

74 Vertreter: Lederer, Franz, Dr. et al,
 Patentanwälte Dr. Franz Lederer Dipl.-Ing. Reiner F.
 Meyer-Roxlau Lucile-Grahn-Strasse 22
 D-8000 München 80(DE)

54 Hexadecansäure- und Hexadecadiensäurederivate.

57 Die neuen Verbindungen der allgemeinen Formel



bedeutet,

hemmen die Pankreaslipase und können bei der Bekämpfung
 oder Verhütung von Obesitas und Hyperlipämien verwendet
 werden.

EP 0 129 748 A1

5. Juni 1984

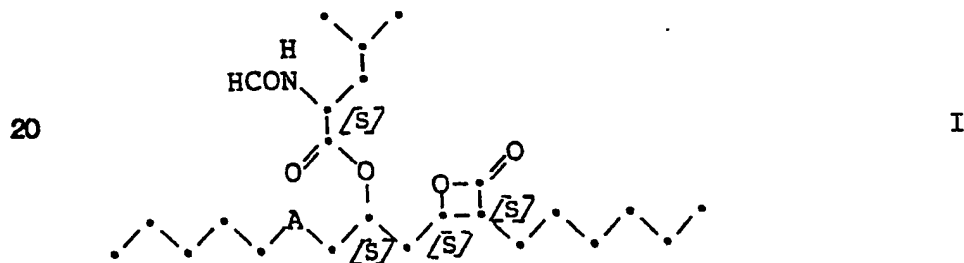
RAN 4039/42

5

Hexadecansäure- und Hexadecadiensäurederivate

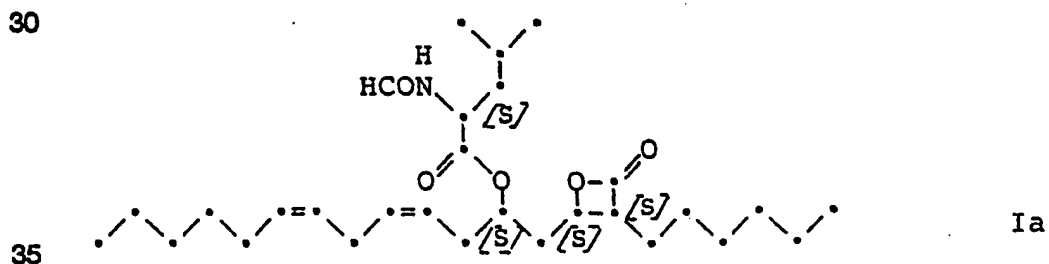
10

15 Die vorliegende Erfindung betrifft Verbindungen der
allgemeinen Formel



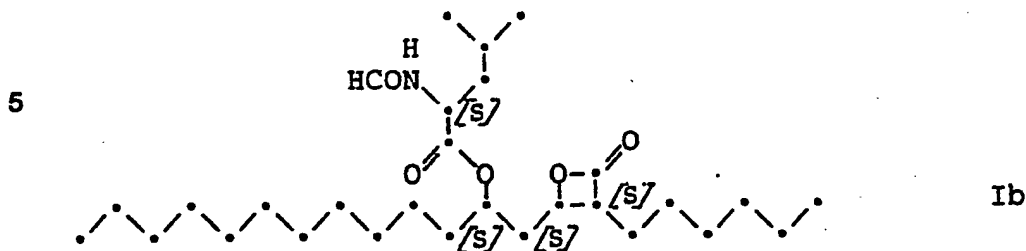
25 worin A die Gruppe $\text{H} \text{---} \text{C} \text{---} \text{C} \text{---} \text{C} \text{---} \text{C} \text{---} \text{H}$ oder $-(\text{CH}_2)_5-$
bedeutet.

Die obige Formel I umfasst das (2S,3S,5S,7Z,10Z)-5-[(S)-2-
Formamido-4-methyl-valeryloxy]-2-hexyl-3-hydroxy-7,10-
hexadecadiensäurelacton der Formel



das nachstehend als Lipstatin bezeichnet wird, und das

(2S,3S,5S)-5-[(S)-2-Formamido-4-methyl-valeryloxy]-2-hexyl-3-hydroxy-hexadecansäur lacton der Formel



das nachstehend als Tetrahydrolipstatin bezeichnet wird.

10

Diese Verbindungen sind neu und besitzen wertvolle pharmakologische Eigenschaften. Sie hemmen insbesondere die Pankreaslipase und können bei der Bekämpfung oder Verhütung von Obesitas und Hyperlipämien verwendet werden.

15

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind die Verbindungen der obigen Formel I als solche und als pharmazeutische Wirkstoffe, die Herstellung dieser Verbindungen, Arzneimittel und industriell gefertigte Lebensmittel, 20 enthaltend eine Verbindung der Formel I, deren Herstellung, sowie die Verwendung dieser Verbindungen bei der Bekämpfung oder Verhütung von Krankheiten.

Die Verdauung der mit der Nahrung aufgenommenen Fette 25 (Triglyceride) erfolgt im Darm durch die Pankreaslipase. Die Pankreaslipase spaltet die primären Esterbindungen von Triglyceriden, wobei als Produkte freie Fettsäuren und 2-Monoglyceride entstehen. Diese Produkte können dann resorbiert und verwertet werden. Durch die Hemmung der 30 Pankreaslipase wird die erwähnte Spaltung der Nahrungsfette und damit auch die Resorption und Verwertung dieser Stoffe teilweise verhindert; die Triglyceride werden unverändert ausgeschieden.

35

Die Hemmung der Pankreaslipase durch die Verbindungen der Formel I kann experimentell gezeigt werden, indem man die bei der Spaltung von Triolein durch Schweinepankreaslipase freigesetzte Oelsäure titrimetrisch erfasst. Zu

einer Emulsion, welche 1 mM Taurodeoxycholat, 9 mM Taurodeoleat, 0,1 mM Cholesterin, 1 mM Eilezithin, 15 mg/ml BSA, 2 mM Tris-HCl, 100 mM Natriumchlorid, 1 mM Calciumchlorid und das Substrat Triolein enthält, gibt man die in Aethanol oder Dimethylsulfoxid (10% des Emulsionsvolumens) gelöste Verbindung der Formel I und startet die Reaktion durch Zugabe von 100 μ l (175 U) Schweinepankreaslipase. Der pH wird während der Reaktion durch Zugabe von Natronlauge bei 8 gehalten. Aus dem während 10 Minuten ermittelten Verbrauch an Natronlauge wird die IC_{50} berechnet. Die IC_{50} ist diejenige Konzentration, bei der die Lipaseaktivität halbmaximal gehemmt wird. Die nachfolgende Tabelle I enthält die für die Verbindungen der Formel I ermittelten IC_{50} -Werte und Angaben über die akute Toxizität (DL_{50} nach einmaliger oraler Verabreichung an Mäusen).

Tabelle I

20	Testverbindung	IC_{50} in μ g/ml	DL_{50} in mg/kg p.o.
	Lipstatin	0,07	> 4000
	Tetrahydrolipstatin	0,18	-

25

Die Hemmung der Resorption der mit der Nahrung aufgenommenen Fette, welche durch die Hemmung der Pankreaslipase bewirkt wird, kann in einem Doppelmarkierungs-Experiment an Mäusen gezeigt werden. Zu diesem Zweck verabreicht man den Versuchstieren eine Testmahlzeit, welche 3H -Triolein und ^{14}C -Oelsäure enthält, und eine Verbindung der Formel I. Durch Messung der Radioaktivität ermittelt man dann die mit dem Kot ausgeschiedene Menge an 3H -Triolein und ^{14}C -Oelsäure (in % der verabreichten Menge). Die in der nachfolgenden Tabelle II aufgeführten Resultate zeigen, dass im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren die Ausscheidung von unverändertem Triglycerid stark erhöht und die Ausscheidung von Oelsäure weitgehend unver-

35

ändert ist.

Tabelle II

5

	Testver- bindung	Anzahl Versuchs- tiere	Dosis	Ausscheidung in % der verabreichten Menge	
				Triolein	Oelsäure
10	Kontrolle	12	-	3,5 \pm 0,3	10,1 \pm 0,6
	Lipstatin	6	40 mg/kg *	56,8 \pm 13	13,8 \pm 5,6

* Die Versuche wurden mit einem Präparat durchgeführt, das
15 etwa 10% Lipstatin enthält. Die angegebene Dosis ist die
verabreichte Menge an Lipstatin.

Die Verbindungen der Formel I können erfindungsgemäss
hergestellt werden, indem man

20

a) zur Herstellung der Verbindung der Formel Ia einen
diese Verbindung produzierenden Microorganismus der Spezies
Streptomyces toxytricini in einem wässrigen Kulturmedium,
das geeignete Kohlenstoff- und Stickstoffquellen und an-
25 organische Salze enthält, aerob kultiviert und die pro-
duzierte Verbindung der Formel Ia aus der Kulturbrühe ab-
trennt, oder

b) zur Herstellung der Verbindung der Formel Ib die Ver-
30 bindung der Formel Ia hydriert.

Aus Bodenproben von verschiedenen Orten konnten Strepto-
mycetenstämme isoliert werden, welche Lipstatin, die
Verbindung der Formel Ia, produzieren. Als Beispiel sei
35 der aus einer in Mallorca, Spanien, gefundenen Bodenprobe
isolierte Microorganismus genannt, der die Laborbezeichnung
Streptomyces sp. 85-13 erhielt und durch CBS, Baarn
(Niederlande), als Streptomyces toxytricini Preobrazhenskaya

& Sveshnikova identifiziert worden ist (vgl. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Edition, Seite 811). Er erhielt hierauf die neue Bezeichnung *Streptomyces toxytricini* 85-13. Eine lyophilisierte Probe dieses Stammes
5 wurde am 14. Juni 1983 bei der Agricultural Research Culture Collection, Peoria, Illinois, unter der Bezeichnung NRRL 15443 hinterlegt.

Es folgt die Beschreibung der Identifizierung von
10 *Streptomyces* sp. 85-13:

Medien

Die Zusammensetzung der verwendeten Medien ist in Int. J. Syst. Bacteriol. 1966, 16, 3; 313-321 beschrieben.

15

Nonomura-Diagramm

Nonomura benutzte die Resultate des International Streptomyces Project (ISP) für die Klassifizierung der Streptomyceten-Spezies (J. Ferment. Technol. 1974, 52, 2).

20

Farben

Die Namen und Code-Nummern der Farben des Luftmycels stammen aus Tresner & Backus, "System of color wheels for streptomycete taxonomy". Die Farben der Kolonierückseiten stammen aus
25 H. Prauser's Selektion aus Baumann's "Farbtonkarte Atlas I".

Methoden

Es wurde gemäss den ISP-Methoden verfahren (vgl. Int. J. Syst. Bacteriol. 1966, 16, 3; 313-340).

30

I. Agarkulturen nach 16 Tagen bei 28°C (Doppelbestimmung)

a) Hafermehlagar

Wachstum: Sehr gut; Kolonien: Dünn, sich ausbreitend; Luftmycel: Samtartig, rosabraun (Light Brown 57); Kolonierück-
35 s it : Gelblich (Pr. Coo-3-m) mit breiten purpur-grauen Rändern (Pr. Oc-6-c); Lösliche Pigmente: Undeutlich.

b) Stärke-Salzagar

Wachstum: Gut; Kolonien: Dünn, sich ausbreitend; Luftmyc 1:
 Samtartig, rosabraun (Light Brown 57) mit weissem Sektor;
 Kolonierückseite: Dunkel strohfarbig (Pr. Coe (Cr)5a),
 5 Ränder und andere Zonen rosa (Pr. Oc-5-b) mit einigen
 dunkelrotbraunen Punkten (Pr. 0-5-5(r)); Lösliche Pigmente:
 Undeutlich. Die stärkeabbauende Aktivität ist sehr ausgeprägt.

c) Glycerin-Asparaginagar

10 Wachstum: Gut; Kolonien: Dünn, sich ausbreitend; Luftmycel:
 Samtartig, hell rosabraun (R4ec: Grayish Yellowish Pink);
 Kolonierückseite: Orange (Pr. Oc-3-m/r); Lösliche Pigmente:
 blass rosabraun.

15 d) Hefe-Malzagar

Wachstum: Gut; Kolonien: Dünn, gross; Luftmycel: Samtartig,
 rötlichbraun (4ge: Light Grayish Reddish Brown 45); Kolonie-
 rückseite: Gelb (Pr. Coe-4-5) und dunkelbraun (Pr. Oc-5-r);
 Lösliche Pigmente: Sehr blasses Gelbbraun.

20

II. Agarkulturen nach 62 Tagen bei 28°C (Doppelbestimmung)a) Hafermehlagar

Wachstum: Gut; Kolonien: Dünn, sich ausbreitend; Luftmycel:
 Pulverig-samtartig, zimtfarbig (R-4ie: Light Brown (57)-Cork
 25 Tan) mit breitem, hellerem Rand (R. 5gc: Light Reddish
 Brown (4.2)-Peach Tan); Kolonierückseite: Gelblichbraun
 mit ockergelbem (Pr. Coe-3-a) Rand, leicht grau gegen das
 hellere Zentrum (Pr. Oc- 4-r); Lösliche Pigmente: Helles
 Ockerbraun.

30

b) Stärke-Salzagar

Wie auf Hafermehlagar, aber mit stärker graubrauner Rück-
 seite (Pr. Oc-6-c) und mit dunkelbraunen Flecken und Ringen
 an den Enden der Kreuzausstriche.

35

c) Glycerin-Asparaginagar

Wie auf Stärke-Salzagar, aber blasser, hell-beige (5ec: Grayish
 Yellowish Pink 32-Dusty Peads). Rückseite: Ockergelb (Pr.: Coe (=Cr)-

4-b), heller im Zentrum; keine löslichen Pigmente.

d) Hefe-Malzagar

- Wachstum: Mässig; Kolonien: Fast wie auf Hafermehlagar, aber
 5 mit sehr schmalem, blass grauem Rand; Rückseite: Dunkelgelb
 (Pr. Co-4-b) dunkelbraun in Randnähe; Lösliche Pigmente:
 Undeutlich.

III. Melanoide Pigmente

- 10 Peptone-Hefeextrakt-Agar: Nach 24 Stunden negativ, nach
 48 Stunden positiv; Tyrosin-Agar: Nach 24 Stunden positiv,
 nach 48 Stunden positiv.

IV. Morphologie des sporulierenden Luftmycels

- 15 Sektion: Spira-Retinaculum Apertum. Verästelungsart: Sympo-
 dial. Spiralen oft irregulär, mit bis zu 5 Windungen und
 verschiedenen Durchmessern.

V. Verwertung von C-Quellen

- 20 Kein oder nur spurenweises Wachstum auf Arabinose, Xylose,
 Inosit, Mannit, Fructose, Rhamnose, Saccharose, Raffinose.

VI. Sporen

- Oval bis zylindrisch-oval, manchmal unregelmässige Grösse,
 25 glatte Oberfläche. Sporenketten mit mehr als 10 Sporen.

VII. Nonomura -Diagramm

R(Gy) 100 SRA sm(+)(+)(+)-

- 30 Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung sind alle
 Streptomycetenstämme geeignet, die den Lipasehemmer
 Lipstatin produzieren, insbesondere Streptomyces toxytri-
 cini 85-13, NRRL 15443, und dessen Subkulturen, Mutanten
 und Varianten.

35

Die Kultivierung dieser Microorganismen zur Herstel-
 lung von Lipstatin kann nach verschiedenen Fermentations-
 methoden durchgeführt werden. Sie kann beispielsweise im
 Schüttelkolben oder in 10 l- oder 200 l- und 1000 l-Fermen-
 tern durchgeführt werden. Eine gewisse Menge Sporenmate-

rial oder Mycelium eines Lipstatin produzierenden Stammes wird in ein flüssiges Medium gebracht, das geeignete Kohlenstoff- und Stickstoffquellen und die für das Wachstum notwendigen Salze enthält, und bei einer Temperatur von 20-37°C während 1-6 Tagen aerob bebrütet. Als Kohlenstoffquellen eignen sich beispielsweise Dextrin, Glucose, Stärke, Ribose und Glycerin. Geeignete Stickstoffquellen sind beispielsweise Hefeextrakt, Pepton oder Sojamehl. Als Salze kommen vorzugsweise Ammonium-, Magnesium- und Calciumsalze in Frage. Die Fermentation wird bei pH 6-8 durchgeführt.

Die Isolierung des Lipstatins erfolgt nach an sich bekannten und jedem Fachmann geläufigen Methoden und kann beispielsweise wie folgt durchgeführt werden:

Man zentrifugiert nach Beendigung der Fermentation die Gärbrühe, wonach 60-90% der Aktivität in der Zellmasse und der Rest im Zentrifugat gefunden werden. Die Zellmasse kann dann mit einem niederen Alkohol, wie Methanol und Aethanol, behandelt und mit dem gleichen Lösungsmittel extrahiert werden. Das Zentrifugat kann mit einem geeigneten organischen Lösungsmittel, z.B. mit Methylenchlorid oder Essigester, extrahiert werden. Das aus den Extrakten gewonnene Material enthält das gewünschte Lipstatin und kann mittels chromatographischer Methoden angereichert und gereinigt werden. Geeignete Methoden sind beispielsweise die multiplikative Extraktion mit dem System Hexan/Methanol/Wasser (50:40:9), die Filtrationschromatographie über Kieselgel unter Eluieren mit Chloroform, die Säulenchromatographie an Kieselgel unter Eluieren mit Hexan, Essigester und Mischungen davon, die Chromatographie an unpolaren Trägermaterialien unter Eluieren mit polaren Lösungsmitteln, wie Methanol (Reversed-Phase-Chromatographie) und die Hockdruck-Flüssigkeits-Chromatographie.

Die weiter unten folgenden Beispiele enthalten detail-

lierte Angaben betreffend die Kultivierung von Streptomyces toxytricini 85-13 und die Isolierung des Lipstatins.

5 Tetrahydrolipstatin, die Verbindung der Formel Ib, kann hergestellt werden, indem man Lipstatin in Gegenwart eines geeigneten Katalysators hydriert. Als Katalysatoren kommen beispielsweise Palladium/Kohle, Platinoxid, Palladium und dergleichen in Frage. Geeignete Lösungsmittel sind beispielsweise niedere Alkohole, wie Methanol und 10 Aethanol. Man arbeitet vorzugsweise bei niedrigen Wasserstoffdrucken und bei Raumtemperatur.

Die Verbindungen der Formel I können als Heilmittel, z.B. in Form pharmazeutischer Präparate, Verwendung finden. 15 Die pharmazeutischen Präparate können oral, z.B. in Form von Tabletten, Lacktabletten, Dragées, Hart- und Weichgelatine kapseln, Lösungen, Emulsionen oder Suspensionen, verabreicht werden.

20 Zur Herstellung von pharmazeutischen Präparaten können die erfindungsgemässen Produkte mit pharmazeutisch inerten, anorganischen oder organischen Trägern verarbeitet werden. Als solche Träger kann man für Tabletten, Lacktabletten, Dragées und Hartgelatine kapseln beispielsweise 25 Lactose, Maisstärke oder Derivate davon, Talk, Stearinsäure oder deren Salze und dergleichen verwenden. Für Weichgelatine kapseln eignen sich als Träger beispielsweise pflanzliche Öle, Wachse, Fette, halbfeste und flüssige Polyole und dergleichen; je nach Beschaffenheit 30 des Wirkstoffes sind jedoch bei Weichgelatine kapseln überhaupt keine Träger erforderlich. Zur Herstellung von Lösungen und Siurpen eignen sich als Träger beispielsweise Wasser, Polyole, Saccharose, Invertzucker, Glukose und dergleichen.

35

Die pharmazeutischen Präparate können daneben noch Konservierungsmittel, Lösungsvermittler, Stabilisierungsmittel, Netzmittel, Emulgiermittel, Süßmittel, Färbemittel,

mittel, Aromatisierungsmittel, Salze, zur Veränderung des osmotischen Druckes, Puffer, Ueberzugsmittel oder Antioxidantien enthalten. Sie können auch noch andere therapeutisch wertvolle Stoffe enthalten.

5

Wie eingangs erwähnt sind Arzneimittel, enthaltend eine Verbindung der Formel I, ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung, weiterhin auch ein Verfahren zur Herstellung solcher Arzneimittel, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass man eine Verbindung der Formel I und gegebenenfalls einen oder mehrere andere therapeutisch wertvolle Stoffe in eine galenische Darreichungsform bringt. Wie eingangs erwähnt, können die Verbindungen der Formel I bei der Bekämpfung oder Verhütung von Krankheiten verwendet werden und zwar insbesondere bei der Bekämpfung oder Verhütung von Obesitas und Hyperlipämien. Die Dosierung kann innerhalb weiter Grenzen variieren und ist natürlich in jedem einzelnen Fall den individuellen Gegebenheiten anzupassen. Im allgemeinen dürfte bei oraler Verabreichung eine Tagesdosis von etwa 0,1 mg bis 100 mg/kg Körpergewicht angemessen sein.

Die Verbindungen der Formel I können auch industriell gefertigten Lebensmitteln zugegeben werden, wobei insbesondere Fette, Öle, Butter, Margarine, Schokolade und andere Konfektartikel in Frage kommen. Solche industriell gefertigte Lebensmittel und deren Herstellung sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

30 Die nachfolgenden Beispiele sollen die vorliegende Erfindung näher erläutern, ihren Umfang jedoch in keiner Weise beschränken. Sämtliche Temperaturen sind in Celsiusgraden angegeben.

35

Beispiel 1a) Fermentation:

Ein Schüttelkolben mit dem Vorkulturmedium 391 wird
5 mit Sporen von Streptomyces toxytricini 85-13 (oder vegetativem Mycel davon) beimpft und 72 Stunden bei 28°C als Schüttelkultur aerob bebrütet. Etwa 2-5 Vol.-% dieser Kultur wird verwendet, um eine Fermentervorkultur von 10 l mit Vorkulturmedium 391 zu beimpfen. Man inkubiert während
10 3 Tagen bei 28°, wobei man mit 1 vvm belüftet und bei 400 RPM rührt. Diese 10 l-Vorkultur wird verwendet um einen 200-l-Produktionsfermenter mit dem Produktionsmedium N7 zu beimpfen. Man fermentiert während 124 Stunden bei 28°, wobei man mit 1,0 vvm belüftet und bei 150
15 RPM rührt. Regelmässige Analysen zeigen nach 124 Stunden eine extrazelluläre lipasehemmende Aktivität von 53 IC₅₀/ml.

Das Vorkulturmedium 391 (pH 7,0) hat folgende Zusammensetzung: 3% Maisstärke, 4% Dextrin, 3% Sojamehl,
20 0,2% (NH₄)₂SO₄, 0,6% CaCO₃ und 0,8% Sojaöl. Der pH wurde auf 7 gestellt. Das Produktionsmedium N 7 (pH 7,0) hat folgende Zusammensetzung: 1% Kartoffelstärke, 0,5% Glucose, 1% Ribose, 0,5% Glycerin, 0,2% Pepton, 2% Sojamehl und 0,2% (NH₄)₂SO₄.

25

b) Aufarbeitung:

Man zentrifugiert die Gärbrühe mittels einer Röhrenzentrifuge, wobei man 175 l Kulturfiltrat und 12 kg Mycel erhält. Das Mycel wird verworfen, und das Kulturfiltrat
30 wird während 10 Minuten auf 80° erhitzt, abgekühlt, nochmals zentrifugiert und bei 30° im Vakuum auf 50 l konzentriert. Man extrahiert dieses Konzentrat mit 50 l Hexan mittels eines kontinuierlich arbeitenden Extraktors, mischt die erhaltene Emulsion mit 50 l Hexan/Essigester (1:1) und
35 trennt die organische Phase ab. Diese wird über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft; man erhält 199 g Rohextrakt I. Die wässrige Phase wird mit Wasser auf 100 l verdünnt und mit 100 l Essigester extrahiert. Man erhält

nach dem Eindampfen der Essigesterlösung 49 g Rohextrakt II. Die wässrige Phase wird anschliessend ein weiteres Mal mit 100 l Essigester extrahiert, wobei nach dem Eindampfen 78 g Rohextrakt III erhalten werden.

5

c) Reinigung:

Die Rohextrakte II und III werden in drei Portionen über je 1 kg Kieselgel 60 (0,040-0,063 mm Korngrösse) filtriert, wobei man mit Chloroform eluiert (Säule: 10 10 x 100 cm). Man erhält auf diese Weise 18,3 g angereichertes Material. 178 g dieser Substanz werden erneut unter Eluieren mit Chloroform über 1 kg Kieselgel filtriert. Man erhält dabei 5,29 g aktives Material. 802 mg dieser Substanz werden mittels Reversed-Phase-Chromatographie an einer im Handel erhältlichen Lobar-Fertigsäule (Lichoprep RP-8, Grösse C) unter Eluieren mit Methanol gereinigt. Man erhält 158 mg (2S,3S,5S,7Z,10Z)-5-[(S)-2-Formamido-4-methyl-valeryloxy]-2-hexyl-3-hydroxy-7,10-hexadecadiensäurelacton (Lipstatin), das bei Raumtemperatur 20 ein gelbliches Öl ist. Bei tiefen Temperaturen ist es wachsartig-kristallin.

Mikroanalyse (20 Stunden im Hochvakuum bei 50° getrocknet):

Berechnet für $C_{29}H_{49}N_1O_5$ (491,713): C 70,84, H 10,04, N 2,85

25

Gefunden: C 70,85, H 9,97, N 2,59

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -19,0^\circ$ (c = 1, in Chloroform).

Massenspektrum (chemische Ionisation mit NH_3 als Reagenzgas): Spitzen u.a. bei m/z 509 ($M+NH_4^+$) und 492 ($M+H^+$). 30

IR-Spektrum (Film): Banden u.a. bei 3318, 3012, 2928, 2558, 2745, 1823, 1740, 1673, 1521, 1382, 1370, 1250, 1191 cm^{-1} .

35

Durch chemischen Abbau des Lipstatins und Vergleich der erhaltenen Bruchstücke mit bekannten Substanzen konnte die absolute Konfiguration festgelegt werden.

Beispiel 2a) Fermentation:

5 Mit einer gemäss Beispiel 1 hergestellten Vorkultur
von *Streptomyces toxytricini* 85-13 (Schüttelkolben und
dann 10 l-Fermentation) wird eine 200 l-Fermentation mit
Produktionsmedium N 16 beimpft. Das Produktionsmedium N 16
entspricht dem in Beispiel 1 verwendeten Produktionsmedium
N 7, enthält jedoch zusätzlich 0,1% Schweineschmalz. Die
10 Fermentation wird während 120 Stunden wie in Beispiel 1
durchgeführt. Nach 120 Stunden beträgt die intrazelluläre
lipasehemmende Aktivität 71 IC₅₀/ml, die extrazelluläre 4
IC₅₀/ml Gärbrühe.

15 b) Aufarbeitung:

Nach Beendigung der Fermentation wird die Gärbrühe
10 Minuten auf 80° erhitzt, anschliessend abgekühlt und
die Zellmasse mittels einer Röhrenzentrifuge aufgetrennt.
Durch zweimaliges Zentrifugieren erhält man 11,4 kg Mycel;
20 das Kulturfiltrat wird verworfen. Das Mycel wird während
30 Minuten in 70 l Methanol verrührt, worauf man die er-
haltene Suspension abnutsch. Der Filterkuchen wird noch-
mals mit 50 l Methanol verrührt und genutscht. Die ver-
einigten methanolischen Extrakte werden auf 1,8 l konzen-
25 triert. Dieses Konzentrat wird dreimal mit je 2 l Butyl-
acetat extrahiert. Aus den vereinigten organischen Phasen
erhält man nach dem Eindampfen 160 g Rohextrakt.

c) Reinigung:

30 Dieser Rohextrakt wird durch multiplikative Extrak-
tion mit dem System Hexan/Methanol/Wasser (5:4:0,9) ge-
reinigt. Zuerst wird die aktive Substanz von der unteren
Phase (uP) in die obere Phase (oP) transferiert. 160 g
Rohextrakt werden in 4 l uP gelöst und im Ausrührgefäss
35 mit 4 l oP gerührt. Nach der Abtrennung der oP wird die uP
ein zweites Mal mit 4 l frischer oP extrahiert. Es bildet
sich eine stabile Emulsion, welcher noch je 4 l uP und oP
zugegeben werden, worauf eine gute Phasentrennung erzielt

wird. Nach der Abtrennung der oP wird die uP noch zweimal mit 8 l frischer oP extrahiert. Die vereinigten oP ergeben nach dem Eindampfen 90,3 g Extrakt. Die extrahierte uP wird verworfen. Nun wird die aktive Substanz von der oP in die uP transferiert. 90,3 g des obigen Extraktes werden in 4 l oP gelöst und mit 4 l uP extrahiert. Nach der Phasentrennung wird die oP noch dreimal mit frischer uP extrahiert. Die oP wird anschliessend verworfen. Die vereinigten uP werden auf 0,7 l wässrige Phase konzentriert, und diese wird achtmal mit insgesamt 0,2 l Essigester extrahiert. Nach dem Eindampfen erhält man 25,8 g Produkt. Die extrahierte wässrige Phase wird verworfen. Die weitere Reinigung dieses Materials erfolgt durch Filtration über 1 kg Kieselgel 60 (0,040-0,063 mm Korngrösse; Säule 10 x 100 cm) unter Eluieren mit Chloroform. Man erhält 649 mg Produkt, das an einer Lobar-Fertigsäule (Lichoprep RP-8, Grösse C) unter Eluieren mit Methanol chromatographiert wird (Reversed-Phase-Chromatographie). Man erhält 204 mg Lipstatin, das gemäss Dünnschichtchromatogramm rein ist.

Beispiel 3

Man löst 138 mg Lipstatin in 10 ml Aethanol, versetzt mit 60 mg 5-proz. Palladium/Kohle und rührt bei Raumtemperatur während 3 Stunden in einer Wasserstoffatmosphäre (Ballon). Anschliessend wird der Katalysator abzentrifugiert. Das Hydrierungsprodukt wird über eine kurze Kieselgelsäule (1 x 5 cm) mit Chloroform chromatographiert. Man erhält 112 mg (2S,3S,5S)-5-[(S)-2-Formamido-4-methylvaleryloxy]-2-hexyl-3-hydroxy-hexadecansäurelacton (Tetrahydrolipstatin) als wachsartigen, schwach gelben Festkörper.

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -32,0^\circ$ (c = 1, in Chloroform).

Massenspektrum (chemische Ionisation mit NH_3 als Reagenzgas): Spitzen u.a. bei m/z 513 ($\text{M}+\text{NH}_4^+$); 496 ($\text{M}+\text{H}^+$) und 452 ($\text{M}+\text{H}^+-\text{CO}_2$).

IR-Spektrum (Film): Banden u.a. bei 3332, 2956, 2921, 2853, 1838, 1731, 1709, 1680, 1665, 1524, 1383, 1249 und 1200 cm^{-1} .

^1H -NMR-Spektrum (270 MHz, CDCl_3): 0,89 (6H); 0,97 (6H);
5 1,15-1,5 (27H), 1,5-1,85 (6H); 1,9-2,25 (2H); 3,24 (1H);
4,32 (1H); 4,68 (1H); 5,03 (1H); 6,43 (1H); 8,07 und 8,21
(1H) ppm.

Beispiel 4

10

a) Fermentation:

Eine 2 l-Schüttelkulturflasche mit Medium 391 wird mit
Sporen einer Schrägagarkultur von *Streptomyces toxytricini*
85-13 beimpft und während 72 Stunden bei 28°C aerob in-
15 kubiert. Danach wird die 2 l-Vorkultur in einen 50 l-Fer-
menter mit Produktionsmedium N 16 übergeführt und bei
 28°C während 77 Stunden mit 0,5 vvm Belüftung inkubiert.
Diese 50 l-Vorkultur wird zur Beimpfung eines 1'000 l-
Fermenters mit Medium N 16 verwendet. Diese Produktions-
20 fermentation wird bei 28°C und 0,5 vvm Belüftung während
91 Stunden durchgeführt, wobei ein Lipstatin-Titer von
73 IC_{50}/ml intrazellulär und 16 IC_{50}/ml extrazellulär er-
reicht wird. Die ganze Gärbrühe wird auf 2°C gekühlt und
zentrifugiert, wobei 41 kg feuchte Biomasse anfallen, die
25 bei -20°C eingefroren werden.

b) Aufarbeitung:

37 kg Mycel werden bei 4°C aufgetaut und mit etwa
40 l Wasser in einem Mixer homogenisiert. Die erhaltene
30 dünnflüssige Suspension wird mit 140 l Methanol versetzt
und während 20 Minuten gerührt. Anschliessend wird über
ein Filtertuch abgenutscht, worauf der Filterkuchen noch
mit 140 l Methanol extrahiert wird. Die Methanolextrakte
werden bei 30°C auf etwa 22 l konzentriert. Das erhaltene
35 Konzentrat wird mit Wasser auf 50 l verdünnt und im Aus-
rührgefäß dreimal mit je 50 l Hexan/Essigester (1:1)
extrahiert. Bei der zweiten und dritten Extraktion erhält
man Emulsionen, die durch Zugabe von etwa 1,4 kg bzw.
0,5 kg Kochsalz gebrochen werden können. Die vereinigten

organischen Extrakte werden konzentriert, über Natriumsulfat getrocknet und bis zum öligen Rückstand eingedampft. Man erhält 428 g Rohextrakt.

5 c) Reinigung:

Dieser Rohextrakt wird in vier Portionen über je 1 kg Kieselgel 60 (0,040 - 0,063 mm Korngrösse) filtriert, wobei man mit Chloroform eluiert (Säule: 10 x 100 cm). Man erhält 70 g angereichertes Präparat, das in zwei Portionen über je 1 kg Kieselgel 60 unter Eluieren mit Hexan/Essigester (Gradient von 9:1 bis 4:1) filtriert wird. Man erhält 4,2 g aktives Material, das man in vier Portionen mittels Reversed-Phase-Chromatographie an einer Lobar-Fertigsäule (Lichoprep RP-8, Grösse C) unter Eluieren mit Methanol reinigt. Man erhält 1,77 g Lipstatin.

Beispiel A

Herstellung von Weichgelatinecapseln folgender Zusammensetzung:

	<u>Menge pro Kapsel</u>
Lipstatin	50 mg
NEOBEE M-5	450 µl

25

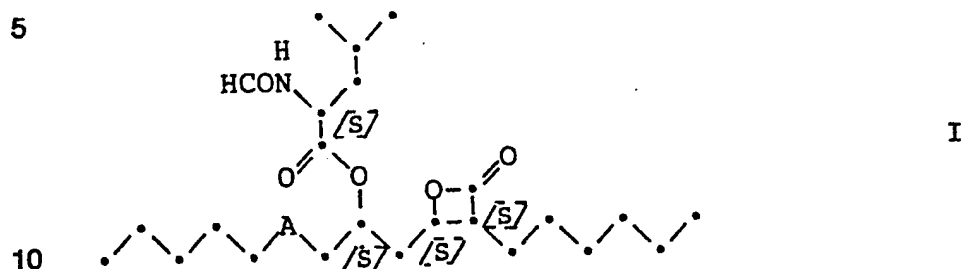
Die Lösung des Wirkstoffes in NEOBEE M-5 wird in Weichgelatinecapseln geeigneter Grösse abgefüllt.

30

35

Patentansprüche

1. Eine Verbindung der allgemeinen Formel



worin A die Gruppe $\text{H}-\text{C}(\text{I})=\text{C}(\text{I})-\text{H}$ oder $-(\text{CH}_2)_5-$ bedeutet.

15

2. (2S,3S,5S,7Z,10Z)-5-[(S)-2-Formamido-4-methyl-valeryloxy]-2-hexyl-3-hydroxy-7,10-hexadecadiensäure-lacton.

20

3. (2S,3S,5S)-5-[(S)-2-Formamido-4-methyl-valeryloxy]-2-hexyl-3-hydroxy-hexadecansäurelacton

4. Eine Verbindung gemäss Anspruch 1, 2 oder 3 zur Anwendung als therapeutischer Wirkstoff.

25

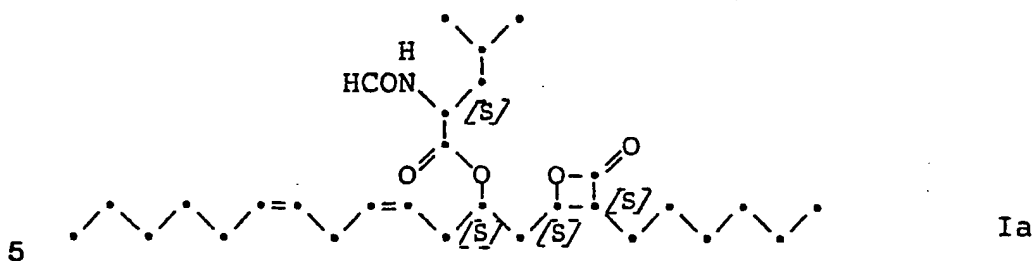
5. Eine Verbindung gemäss Anspruch 1, 2 oder 3 zur Anwendung als ein die Pankreaslipase hemmender Wirkstoff.

6. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung gemäss Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass man

30

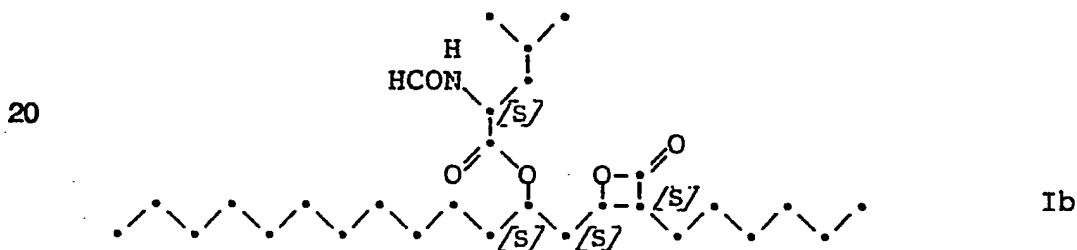
a) zur Herstellung von (2S,3S,5S,7Z,10Z)-5-[(S)-2-Formamido-4-methyl-valeryloxy]-2-hexyl-3-hydroxy-7,10-hexadecadiensäurelacton der Formel

35



einen die Verbindung der Formel Ia produzierenden Micro-
organismus der Spezies *Streptomyces toxytricini* in einem
wässrigen Kulturmedium, das geeignete Kohlenstoff- und
10 Stickstoffquellen und anorganische Salze enthält, aerob
kultiviert und die produzierte Verbindung der Formel Ia
aus der Kulturbrühe abtrennt, oder

b) zur Herstellung von (2S,3S,5S)-5-[(S)-2-Formamido-4-
15 methyl-valeryloxy]-2-hexyl-3-hydroxy-hexadecansäurelacton
der Formel



25 die Verbindung der Formel Ia hydriert.

7. Verfahren gemäss Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet,
dass man als Microorganismus *Streptomyces toxytricini* NRRL
15443 oder die Verbindung der Formel Ia produzierende
30 Subkulturen, Varianten oder Mutanten davon verwendet.

8. Arzneimittel, enthaltend eine Verbindung gemäss
Anspruch 1, 2 oder 3 und ein therapeutisch inertes Träger-
material.

35

9. Arzneimittel gemäss Anspruch 8, welche die
Pankreaslipase hemmen.

10. Industriell gefertigte Lebensmittel, enthaltend
eine Verbindung gemäss Anspruch 1, 2 oder 3.

5

10

15

20

25

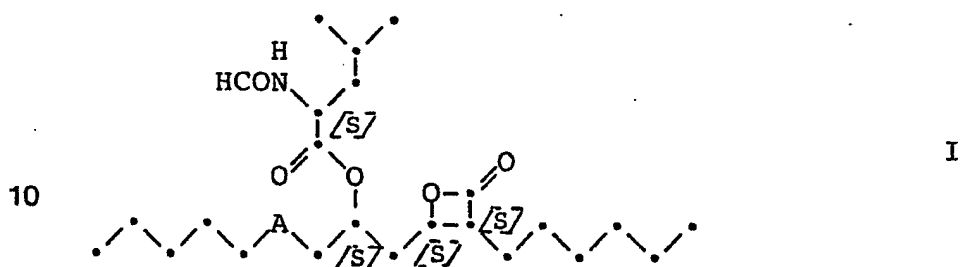
30

35

Patentansprüche für Oesterreich

1. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der allgemeinen Formel

5



15

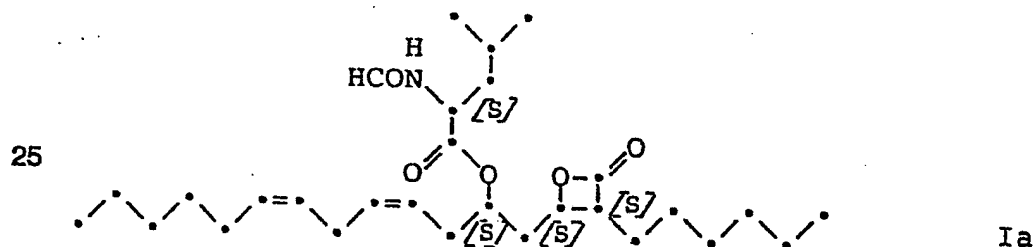
worin A die Gruppe
bedeutet,



oder $-(CH_2)_5-$

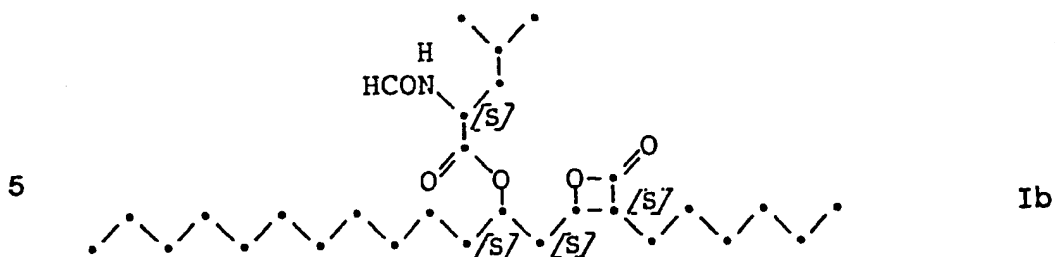
dadurch gekennzeichnet, dass man

a) zur Herstellung von (2S,3S,5S,7Z,10Z)-5-[(S)-2-Forma-
20 mido-4-methyl-valeryloxy] —2-hexyl-3-hydroxy-7,10-hexa-
decadiensäurelacton der Formel



einen die Verbindung der Formel Ia produzierenden Micro-
organismus der Spezies Streptomyces toxytricini in einem
30 wässrigen Kulturmedium, das geeignete Kohlenstoff- und
Stickstoffquellen und anorganische Salze enthält, aerob
kultiviert und die produzierte Verbindung der Formel Ia
aus der Kulturbrühe abtrennt, oder

35 b) zur Herstellung von (2S,3S,5S)-5-[(S)-2-Formamido-4-
methyl-valeryloxy] —2-hexyl-3-hydroxy-hexadecansäurelacton
der Formel



die Verbindung der Formel Ia hydriert.

10

2. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man als Microorganismus *Streptomyces toxytricini* NRRL 15443 oder die Verbindung der Formel Ia produzierende Subkulturen, Varianten oder Mutanten davon verwendet.

15

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man (2S,3S,5S,7Z,10Z)-5-[(S)-2-Formamido-4-methyl-valeryloxy] —2-hexyl-3-hydroxy-7,10-hexadecadiensäure-lacton herstellt.

20

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man (2S,3S,5S)-5-[(S)-2-Formamido-4-methyl-valeryl-oxy]-2-hexyl-3-hydroxy-hexadecansäurelacton herstellt.

25

30

35



Europäisches
Pat ntmnt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

0129748

Nummer der Anmeldung

EP 84 10 6420

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 3)
A	FR-A-2 379 531 (ZAIDAN HOJIN) * Seite 25 *	1,4	C 07 D 305/12 // (C 07 D 305/12 C 12 P 17/02 C 12 R 1/465)
A	FR-A-2 426 679 (ZAIDAN HOJIN) * Seiten 17,18 * -----	1,4	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl. 3)
			C 07 D 305/00
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 12-09-1984	Prüfer FRANCOIS J.C.L.
<div>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN</div> <div>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze</div> <div>E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</div>			